

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Michaela Vlková

PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ KAPILÁRNÍCH MONOLITICKÝCH KOLON PRO HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRAPHII

Preparation and testing of capillary monolithic columns for hydrophilic
interaction chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 7. června 2015.

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat své školitelce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za profesionální vedení, trpělivost, cenné rady a také za čas, který se mnou strávila při vyhotovení mé diplomové práce. Dále děkuji všem ostatním, kteří mi během vzniku této práce poskytli svoji pomoc.

Svým rodičům děkuji za umožnění mého vysokoškolského studia.

Abstrakt

V rámci této práce byly připraveny monolitické stacionární fáze na bázi hydroxymethyl methakrylátu v křemenných kapilárách s vnitřním průměru 320 μm . Kolony byly připravovány jednoduchým způsobem z polymerizační směsi, která obsahovala monomer N-(hydroxymethyl) methakrylamid (HMMAA), síťující činidlo ethylen dimethakrylát (EDMA), porogenní směs butan-1,4-diol, propanol a iniciátor polymerizace α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN). Připravené HMMA monolitické kolony byly využity pro separaci modelových směsí biologicky aktivních látek, konkrétně peptidů s malým počtem aminokyselin. Některé připravené monolitické kolony byly testovány ve smyslu základních chromatografických parametrů, a to ve smyslu mechanické pevnosti a specifické permeability.

Klíčová slova:

HPLC, HILIC mechanismus, hydroxymethyl methakrylátové (HMMA) monolitické kolony, aminokyseliny, enkefaliny.

Abstract

In frame work of this diploma thesis, monolithic stationary phases based on hydroxymethylmethacrylate were prepared in fused silica capillaries of 320 μm innerdiameter. Monolithic columns were synthesized by a simple procedure using a polymerization mixture, consisting of a monomer N-(hydroxymethyl) methacrylamide (HMMAA), a croslinking agent ethylene dimethacrylate (EDMA), porogenic solvents butane-1,4-diol, propane-1-ol and an initiator α,α' -azobisisobutyronitrile (AIBN). Prepared HMMA monolithic columns were utilized for separation of mixtures of biologically active compounds, namely peptides with small number of amino acids. Mechanical strength and specific permeability were determined for selected monolithic columns.

Keywords:

HPLC, HILIC mechanism, hydroxymethyl methacrylate (HMMA) monolithic columns, amino acid, enkephalins.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	11
1.1.1 HPLC systémy.....	11
1.1.2 Instrumentace v HPLC	13
1.2 Monolity.....	15
1.2.1 Typy monolitů	16
1.2.2 Příprava monolitických kolon na bázi organického polymeru.....	17
1.2.3 Hydroxymethyl methakrylátové (HMMA) monolitické kolony	19
1.2.4 Využití monolitických kolon.....	19
1.3 Peptidy	22
1.3.1 Pentapeptidy	22
1.3.1.1 Enkefaliny	22
2 Cíl práce.....	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Použité přístroje	26
3.2 Použité chemikálie.....	26
3.3 Postup přípravy vzorků a mobilních fází	28
3.3.1 Příprava vzorků benzenu, toluenu, uracilu	28
3.3.2 Příprava vzorků aminokyselin	28
3.3.3 Příprava vzorků pentapeptidů.....	28
3.3.4 Příprava mobilních fází	28
3.4 Postup přípravy monolitických kolon.....	29

3.4.1	Příprava monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové	29
3.4.2	Příprava monolitických kolon na bázi hydroxymethyl methakrylátu (HMMA).....	31
3.5	Testování HMMA monolitických kolon.....	32
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Monolitické kolony na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové..	33
4.2	HMMA monolitické kolony	33
4.3	Testování připravené HMMA monolitické kolony	43
5	Závěr	46

Seznam zkratek

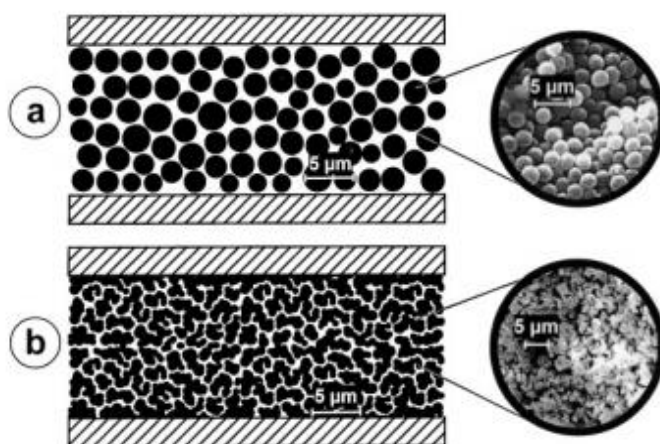
°C	stupeň Celsia, jednotka teploty
AIBN	α,α' -azobisisobutyronitril
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
CLC	kapilární kapalinová chromatografie
Cys	cystein
DMPAP	2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon
DVB	divinylbenzen
EDMA	ethylen dimethakrylát
FA	kyselina mravenčí
Gln	glutamin
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
GPC	gelová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
His	histidin
HMMA	hydroxymethyl methakrylát
HMMAA	<i>N</i> -(hydroxymethyl) methakrylamid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
Ile	isoleucin
LC	kapalinová chromatografie
Leu	leucin

Lys	lysin
M	mol/litr, jednotka koncentrace
MAA	kyselina methakrylová
MAPS	3-(methoxysilyl)propylmethakrylát
Met	methionin
MF	mobilní fáze
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PEEK	polyetheretherketon
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
PS-DVB	polystyren-divinylbenzen
PTFE	polytetrafluorethen
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
Ser	serin
SF	stacionární fáze
ST	styren
T	toluen
TFA	trifluoroctová kyselina
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialové záření
v/v	„volume/volume“, objem/objem
Val	valin

1 Úvod

V posledních desetiletích je velká pozornost věnována zjednodušení a urychlení separačních metod. Toho bylo dosaženo například miniaturizací separačních kolon a i ostatních částí kapalinového chromatografu. Miniaturizace separačních kolon ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) vedla k vývoji kapilární kapalinové chromatografie (CLC).^[1,2] Miniaturizace přináší velkou řadu výhod ve srovnání s klasickou HPLC. Mezi velmi atraktivní výhody vyplývající z miniaturizace patří nízká spotřeba vzorků, mobilních a stacionárních fází, menší zátěž pro životní prostředí, zvýšení citlivosti detekce, vysoké rozlišení a snadné spojení s detektory jako je například hmotnostní spektrometr.^[3]

Pro miniaturizaci kolon v kapalinové chromatografii (LC) jsou velmi vhodné tzv. monolity. Monolitické kolony mají lepší vlastnosti než kolony náplňové. Největší výhodou monolitických kolon ve srovnání s klasickými částicemi plněnými kolonami jsou jejich hydrodynamické vlastnosti a další podstatnou výhodou je jejich jednoduchá příprava. Použití těchto kolon zvyšuje efektivitu separace a umožňuje pracovat za vyššího hydrodynamického tlaku. To vše vede ke zlepšení a urychlení separace.^[4] Rozdíl ve struktuře monolitické a klasické náplňové kolony je znázorněn na obr. 1.^[5]



Obr. 1.: Morfologie stacionární fáze (a) v náplňové a (b) v monolitické koloně.^[5]

1.1 HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V dnešní době jsou nejvíce využívány tři typy kapalinové chromatografie planární chromatografie, nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC představuje pokročilou, instrumentálně náročnou techniku a patří mezi separační metody. Poskytuje jak kvalitativní, tak kvantitativní informaci o analyzovaných látkách. Je založená na rovnovážné distribuci analytů mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, a to mezi stacionární a mobilní fází, podle své afinity k použitým fázím. Stacionární fáze je nepohyblivá a bývá označována jako sorbent. Mobilní fáze je pohyblivá a je pod vysokým tlakem protlačována stacionární fází.^[6]

1.1.1 HPLC systémy

V HPLC se využívá více separačních módů. Nejdéle používaným je systém s normálními fázemi (Normal Phase-HPLC, NP-HPLC). U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární. Stacionární fází bývá nejčastěji nemodifikovaný silikagel, Al_2O_3 (alumina) nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se používá nepolární rozpouštědlo, například hexan. Pomocí této techniky se separují polární látky. Obecně platí, že čím je látka polárnější, tím má vyšší afinitu ke stacionární fází. Tento systém má určité nevýhody oproti separacím v jiných systémech, proto se tento systém v dnešní době používá velmi omezeně.^[7]

Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) může být chápána jako chromatografie na normální fází s vodnými mobilními fázemi. Polární je tedy jak mobilní, tak i stacionární fáze. Stacionární fází může být například silikagel, polární vázané fáze, polární polymerní fáze nebo iontoměniče. Jako mobilní fáze je používána například voda, acetonitril či směs vodného pufru s organickým rozpouštědlem. Retence analytů se zvyšuje s jejich polaritou. Snížení retence lze dosáhnout zvýšením polarity mobilní fáze, která roste s rostoucím podílem vody nebo vodného pufru. HILIC mód se používá především při separaci polárních a ve vodě rozpustných analytů ionogenní i neionogenní povahy.

Klasickým příkladem separace technikou HILIC je separace sacharidů, aminokyselin, peptidů a polárních organických kyselin a zásad.^[8]

Systém s obrácenými fázemi (Reversed Phase-HPLC, RP-HPLC) je v současné době nejrozšířenějším a nejpoužívanějším typem kapalinové chromatografie. Tento systém využívá nepolární stacionární fáze či slabě polární fáze chemicky vázané na povrchu anorganického nosiče, což nejčastěji bývá silikagel modifikovaný oktadecylovou či oktylovou funkční skupinou, ale i chemicky vázané fenylové či nitrilové fáze, i organické polymerní sorbenty s hydrofobním povrchem. Mobilní fází je nejčastěji směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly jako acetonitril nebo alkoholy. Dělené látky, které jsou rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle, se svými hydrofobními částmi zachycují na koloně a jsou s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi z kolony postupně vymývány podle své rostoucí hydrofobnosti.^[6, 7, 9]

Chromatografie na měničích iontů (Ion Exchange Chromatography, IEC) je založena na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze a ionty v okolním roztoku. Při iontové výměně sorbované ionty difundují z okolního roztoku do ionexu, vytěsňují a vyměňují ekvivalentní množství jiných iontů vázaných na ionexových skupinách. Při IEC se jako stacionární fáze používají měniče iontů s chemicky vázanými iontově výměnnými skupinami na povrchu silikagelu nebo ionexy s vhodně modifikovanou organickou polymerní maticí, nejčastěji na bázi styren-divinylbenzenového kopolymeru či hydrofilních gelů. Mobilní fází jsou převážně vodné roztoky solí, kyselin nebo zásad. Eluční síla mobilní fáze závisí na koncentraci iontů tvořících mobilní fázi, jejich náboji a pH. IEC se používá pro separaci organických i anorganických kationtů a aniontů nebo amfoterních iontů, jako jsou aminokyseliny, peptidy a jiné amfoterní látky, které se ve vodných roztocích vyskytují ve formě obojetných iontů, tzv. zwitteriontů, jejichž náboj závisí na pH okolního prostředí.^[6, 7, 8]

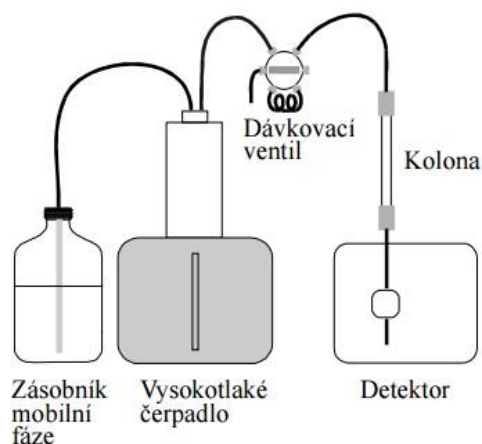
Gelová chromatografie je metoda, která je v některých publikacích též označována jako chromatografie na molekulových sítích, případně jako gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography, GPC). Jedná se o chromatografii, kde stacionární fází je porézní gel. Různé gely se vzájemně odlišují velikostí pórů, do nichž mohou molekuly pronikat. Hloubku průniku určuje velikost

molekuly a velikost pórů, k separaci molekul tedy dochází na základě jejich velikosti. Malé molekuly pronikají do všech pórů, a proto jsou zadržovány nejdéle. Největší molekuly, jejichž velikost překračuje velikost pórů, nepronikají do pórů vůbec a jsou bez retence vymývány z kolony. Nejrozšířenější stacionární fází jsou gely na bázi sesíťovaného polystyrenu, dále pak sesíťovaný dextran, porézní rigidní skla nebo silikagel. Jako mobilní fáze se často používá voda nebo vodné roztoky pufrů. Tato metoda se nejvíce uplatňuje v biochemii při separaci polypeptidů a bílkovin.^[6, 8, 10]

Afinitní chromatografie bývá též označována jako bioafinitní nebo biospecifická chromatografie, která využívá biospecifických interakcí mezi dvojicemi komplementárních látek. Jeden z partnerů se pevně chemicky naváže jako ligand na vhodný nosič a spolu s ním tak tvoří stacionární fázi. Druhý z partnerů je obsažen ve vzorku a za vhodných podmínek je na koloně specificky navázán pevnými, ale reverzibilními interakcemi na ligand. Při důkladném promytí kolony vhodným roztokem dochází k odstranění všech na koloně nespecificky zadržených složek. Požadovaná látka je pak následně eluována elučním činidlem. Jako inertní nosič může být využito porézní sklo, křemičité materiály, polyakrylamid, vláknitá celulóza či Sephadex. Metoda afinitní chromatografie se používá k čištění nukleových kyselin, kofaktorů, enzymů, protilátek a pro mnoho dalších biologicky aktivních látek.^[10,11,12]

1.1.2 Instrumentace v HPLC

Přístroje pro HPLC jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou LC. Základní přístrojové vybavení pro HPLC se skládá ze zásobníků mobilní fáze, směšovače mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího ventilu se smyčkou, termostatu, separační kolony, detektoru a zařízení pro záznam a zpracování dat (nejčastěji počítač). Základní schéma přístroje pro HPLC je znázorněno na obr. 2.



Obr. 2.: Schéma přístroje pro HPLC.^[6]

Odplyněná mobilní fáze se přivádí ze skleněných zásobníků přes fritu do čerpadla. K odplynění se používá podtlak, ultrazvuk či probublávání heliem, popřípadě kombinace těchto postupů.^[8]

Průtok mobilní fáze musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulzní. Jelikož jsou využívány kolony s velikostí částic okolo 10 μm a menší, které kladou velký odpor průtoku mobilní fáze, používají se vysokotlaká čerpadla. Tato čerpadla dokážou vyvinout tlak o velikosti až desítek MPa, které jsou pro požadovaný konstantní průtok nutné. Pro kapilární kolony se tyto průtoky pohybují v $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$, v $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pro mikro kolony, přibližně kolem 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro běžné náplňové kolony a v desítkách $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro preparativní kolony.^[13]

Směšování mobilních fází může probíhat dvěma způsoby, a to za nízkého tlaku a za vysokého tlaku. Pro první způsob stačí pouze jedno čerpadlo a složky se mísí daleko od kolony. Druhý způsob vyžaduje dvě čerpadla a k míšení dochází těsně před kolonou.^[6,13]

Mobilní fáze dále putuje z čerpadla do dávkovacího zařízení. Nejčastěji se používají dávkovací ventily se smyčkou, což obvykle bývají šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou o fixním objemu, které se plní injekční stříkačkou. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitů po mikrolitry. Dávkování pomocí těchto šesticestných ventilů je reprodukovatelné a lze jej snadno automatizovat.^[6]

Následně putuje mobilní fáze i se vzorkem do kolony, která může být vyrobena z nerezové oceli, ze skla či plastu (PEEK). Délka kolon se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 10 až do 25 cm a jejich vnitřní průměr bývá kolem 3; 4 nebo 4,6 mm.^[8,10] Kolony pro mikrokolonovou HPLC se dají rozdělit do tří kategorií, jako jsou otevřené kapiláry, plněné kapiláry a mikrokolony. Otevřené kapiláry s vnitřním průměrem 50 μm nebo i menším, které mají chemicky modifikovaný povrch nebo kapalný film jako stacionární fázi, mohou být použity jako normální nebo reverzní fáze. Plněné kapiláry mají typický rozměr 15 cm \times 75 μm a je možné je plnit běžnými HPLC fázemi nebo monolity. Mikrokolony mají průměr do 1 mm a podobají se obvyklým HPLC kolonám.^[14] Kolony mohou být umístěny v termostatu, pomocí něhož mohou být temperovány na určitou teplotu.

Mobilní fáze je z kolony vedena do detektoru, kde vzniká signál, který se vyhodnocuje počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením.

Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou propojeny spojovacími kapilárami, které jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo z polytetrafluorethenu (PTFE).

1.2 Monolity

Monolitické kolony se snadno připravují začleněním vodných monomerních jednotek do bloku porézního polymeru. Tento polymer je umístěn uvnitř separační kolony a plní funkci stacionární fáze. Monolitické kolony nepotřebují žádné koncové frity, protože monolit je trvale upevněn k vnitřní stěně kapiláry kovalentní vazbou.^[15]

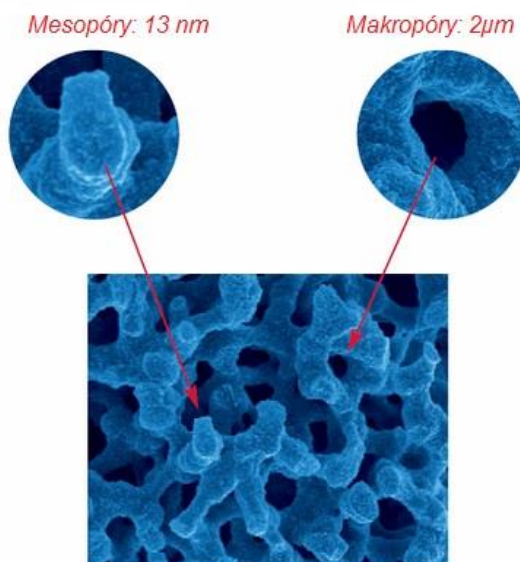
V sedmdesátých letech minulého století byl proveden M. Kubínem a jeho kolektivem první pokus o vytvoření monolitického separačního média.^[16] Radikálovou polymerací vodného roztoku 2-hydroxyethylmethakrylátu a síťujícího ethylendimethakrylátu byl ve skleněné trubici připraven houbovitý polymerní gel. Po jeho vyjmutí a vyvaření ve vodě byl vložen do skleněné kolony. Efektivita a průchodnost takto vytvořeného separačního média však byla velice malá.

V současnosti, díky jednoduché přípravě monolitů, lze připravit mnoho typů polymerů, jejichž efektivita a průchodnost je velmi vysoká, a lze je použít pro separaci různých typů analytů.^[16]

1.2.1 Typy monolitů

Rozlišují se dva základní typy monolitických stacionárních fází: anorganické monolity na bázi oxidu křemičitého, jiným názvem silika, a monolity z organických polymerních materiálů jako polystyren, polyakrylamid či methakrylát.

První anorganické monolitické stacionární fáze na bázi silikagelu připravili a popsali vědci Nakanashi a Tanaka.^[15,17] Tyto fáze se připravují hydrolytickou polymerací tetramethoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové v přítomnosti polyethylenglykolu. Technický postup výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou. Vznikají pouze mesopóry a makropóry požadovaných rozměrů. Obr. 3 znázorňuje mesopóry a makropóry monolitu na bázi silikagelu.^[8]



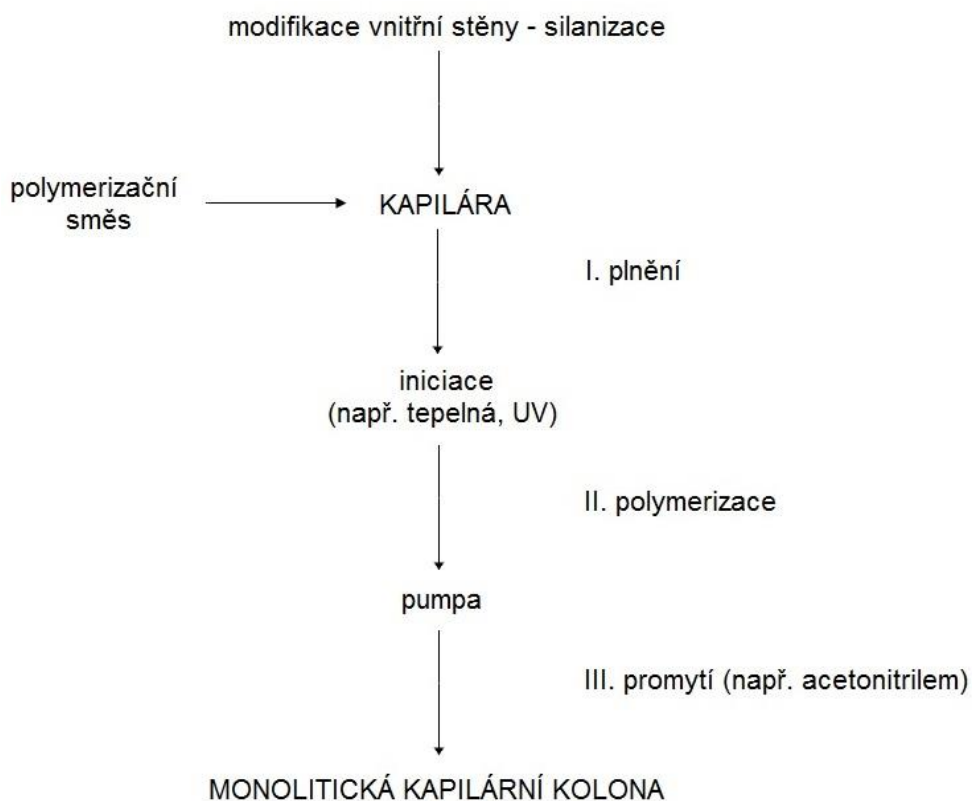
Obr. 3.: Mesopóry a makropóry monolitu na bázi silikagelu.^[8]

Jako první organické monolity byly vytvořeny monolitické kolony na bázi akrylamidu, které se připravují polymerací akrylamidu či jeho derivátů a síťujícího methylenbisakrylamidu.^[18] Další monolitické kolony byly zhotoveny na bázi polystyrenu. Ty se připravují polymerací styrenu, popřípadě jeho derivátů a síťujícího divinylbenzenu. Další skupinu tvoří monolity na bázi methakrylátu, které lze připravit polymerací butylmethakrylátu nebo jiných esterů kyseliny methakrylové a síťujícího ethylen dimethakrylátu.^[19,20,21]

Monolity lze využít jako stacionární fáze nejen v HPLC, ale také v plynové chromatografii či elektrochromatografii.^[21,22]

1.2.2 Příprava monolitických kolon na bázi organického polymeru

Obecný postup přípravy monolitických kolon na bázi organického polymeru v křemenné kapiláře znázorňuje obr. 4.



Obr. 4.: Schéma přípravy kapilární kolony s organickou monolitickou stacionární fází.^[23]

Monolitická stacionární fáze musí být pevně spojena s vnitřní stěnou kapiláry, aby se zabránilo jejímu vytlačení vlivem vysokých tlaků, které na ni působí. Toto spojení se provádí procesem silanizace, při němž se nejprve aktivuje vnitřní povrch kapiláry hydroxidem sodným a vodou.^[23] Tím dochází k převodu siloxanových skupin na silanolové. Následně probíhá reakce silanolových skupin se silanizačním činidlem, kterým může být např. 3-(methoxysilyl)propylmethakrylát (MAPS). Při procesu

silanizace hraje důležitou roli čas, teplota, použité rozpouštědlo, koncentrace silanizačního činidla a hydroxidu. Výběr silanizačních podmínek ovlivňuje nejen charakter vnitřní stěny kapiláry (kontaktní úhel, smáčivost a adheze), ale i vlastnosti budoucí monolitické stacionární fáze.^[24]

Chemická podstata monolitů i jejich morfologie se může změnit výběrem monomerů. Monomery se od sebe liší jak sférickými, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi, různě interagují se složkami porogenní směsi a mají také odlišnou reakční kinetiku. Morfologii výsledného monolitu významně ovlivňuje i množství síťovacího činidla přidávaného do polymerizační směsi.^[23]

Pro přípravu organických monolitů se používá polymerizační směs, která se skládá z monomeru, síťovacího činidla, iniciátoru polymerace a porogenní směsi, která určuje svým složením konečnou porozitu vznikajícího monolitu, solvatuje jej, ale není zabudována do polymerní struktury monolitu.^[23]

Radikálová polymerizace při přípravě organických monolitů může být zahájena mnoha postupy, a to teplem, UV zářením či vysoko energetickým zářením (γ -paprsky nebo elektronový paprsek).^[25]

Termická iniciace patří mezi nejjednodušší a nejpoužívanější způsoby iniciace polymerace. Při této polymeraci vyšší teplota způsobuje tvorbu volných radikálů. Jako iniciátor polymerizace se používá α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN). Polymerizace probíhá několik hodin až den.^[23,24]

Druhým nejčastěji používaným způsobem je polymerizace iniciovaná UV zářením. Ve srovnání s tepelně iniciovanou polymerizací, fotopolymerizace probíhá již při laboratorní teplotě a je výrazně rychlejší. Může být dokončena během několika minut. Vzhledem k tomu, že probíhá při pokojové teplotě, mohou být použity složky porogenní směsi s nižším bodem varu (methanol, ethanol, chloroform, ethylester kyseliny octové, hexan), které by se jinak při teplem iniciované polymerizaci odpařily. Pro tuto techniku je velmi důležité použít kolony, které jsou vytvořené z materiálu dobře prostupného pro UV záření. Toho lze snadno dosáhnout použitím křemenných kapilár potažených teflonem na rozdíl od běžně používaného polyimidu. Jako iniciátor se opět může použít AIBN, ale i 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon (DMPAP).^[23,24]

Dále může být polymerace iniciována vysoce energetickým elektromagnetickým zářením, jako jsou γ -paprsky nebo elektronový paprsek. Hlavními výhodami tohoto

typu polymerace je, že není potřeba iniciátoru, polymerace může být prováděna při jakékoliv teplotě a těla kolony mohou být vytvořena z různých materiálů včetně nerezové oceli. Jistou nevýhodou je omezený přístup ke zdroji γ -záření a velký důraz kladený na bezpečnost při práci s radiací. Ionizační záření vytváří nejen ionty, které mohou iniciovat polymerační reakci, ale i volné radikály, a to v mnohem větším počtu. V průběhu tohoto typu polymerace se musí udržovat konstantní teplota, protože polymerace je exotermní reakcí a navíc část vysoce energetického záření je absorbována a přeměňována na teplo.^[23,24]

1.2.3 Hydroxymethyl methakrylátové (HMMA) monolitické kolony

HMMA kolony patří mezi polymerní monolity, které jsou vyrobeny z organických materiálů. Základní stavební jednotkou tohoto polymeru je hydroxymethylmethakrylamid.^[8] U tohoto typu monolitů vzniká chemická vazba mezi monolitem a vnitřní stěnou kapiláry díky funkčnímu monomeru, který je obsažen v polymerizační směsi. Není tedy třeba provádět silanizaci vnitřní stěny kapiláry pomocí silanizačního činidla jako u ostatních typů monolitů. Vnitřní povrch křemenné kapiláry se aktivuje jen 1M hydroxidem sodným při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Příprava kapiláry k naplnění polymerizační směsí pokračuje promýváním deionizovanou vodou po dobu 30 minut a následným sušením proudícím vzduchem po dobu 5 minut. Takto upravená kapilára je naplněna polymerizační směsí, která se skládá z iniciátoru polymerizace AIBN, funkčního monomeru N-(hydroxymethyl) methakrylamidu (HMMAA), síťujícího činidla ethylen dimethakrylátu (EDMA) a porogenní směsi složené z butan-1,4-diolu a propanolu.^[26] Takto připravené monolity byly úspěšně využity pro HILIC separaci biologicky aktivních makromolekul, konkrétně oligonukleotidů.

1.2.4 Využití monolitických kolon

Monolitické kolony se využívají pro separaci velkých molekul i malých molekul s různými vlastnostmi. Některé příklady využití monolitických kolon jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1.: Přehled separací malých i velkých molekul na monolitických kolonách.

Separční metoda	Typ monolitické kolony	Rozměry kolony	Složení mobilní fáze	Detekce	Analyty	Citace
RPLC	na bázi silikagelu	10 cm x 4,6 mm ID	acetonitril/voda obsahující 0,1 % TFA gradient. program	MALDI MS	peptid (hovězí cytochrom c)	27
HPLC	na bázi silikagelu	25 cm x 3 mm ID	acetonitril/ voda obsahující 0,12 % TFA 90/10 (v/v) gradient. program	fluorescenční detektor	aminokyseliny modif. NBD-F (např. His, Ser, Arg)	28
HILIC, IEC	na bázi silikagelu	20 cm x 200 µm ID	20 mM pufr fosforečnanu sodného (pH 6,9)	UV detekce při 280 nm	nukleové kyseliny, proteiny	29
CLC	PS-DVB + C18	<i>PEEK</i> – 1,25 m x 125 µm ID <i>Nerezová ocel</i> - 10 cm x 125 µm ID <i>Křemenné kapiláry</i> – 90 cm x 75 µm ID, 375 µm OD	voda s 0,1% TFA (v) acetonitril s 0,1% TFA (v) gradient. program	nano-ESI MS	proteiny (např. hovězí ribonukleáza A, koňský cytochrom c, kuřecí lysozym), peptidy (např. methionin enkefalin, leucin enkefalin, oxytocin)	30
GPC	PS-DVB	17 cm x 8mm ID	100% tetrahydrofuran	UV detekce při 254 nm	malé molekuly (alkylbenzen, uracil)	31

Tabulka 1.: Přehled separací malých i velkých molekul na monolitických kolonách (pokračování).

Separační metoda	Typ monolitické kolony	Rozměry kolony	Složení mobilní fáze	Detekce	Analyty	Citace
UHPLC	PS-DVB	5 cm x 200 µm ID	acetonitril s 0,04% FA /voda s 0,05% FA 80/20 (v/v)	UV detekce při 210 nm	proteiny (např. hovězí cytochrom c, lysozym, alkohol dehydrogenáza, BSA)	32
CLC	PS-DVB-MAA	17 cm x 320 µm ID	acetonitril/voda 65/35 (v/v)	UV detekce při 214 nm	malé organické molekuly (thiomočovina, fenol, anilin, benzen, toluen, alkylbenzen)	33
µ-HPLC	TVBS	5 cm x 0,2 mm ID	acetonitril/voda gradient. program	UV/Vis detekce při 214 nm	malé molekuly (alkylbenzen, toluen)	34
HPLC	DVB- co -EVB- co -HEMA	15 cm x 3 mm ID	acetonitril/voda 60/40 (v/v)	UV detekce při 210 nm	malé aromatické sloučeniny (uracil, pyridin, alkylbenzeny, benzen, toluen)	35
nano-LC	EDMA-BUMA	20 cm x 100 µm ID	acetonitril/voda 50/50 (v/v)	UV detekce při 254 nm	malé molekuly (alkylbenzeny, uracil, benzen, toluen)	36
CLC	HMMAA	18 cm x 320 µm ID, 450 µm OD	acetonitril/voda gradient. program	UV/VIS detekce při 260 nm	oligonukleotidy	26

1.3 Peptidy

Peptidy patří mezi významné biologicky aktivní látky, které jsou syntetizovány ve všech živých organismech. Peptidy se v těle člověka zapojují do procesu regenerace a růstu buněk, řádného fungování imunitního systému, tělesného metabolismu, regulace spánku, tvorby hormonů a plní mnoho dalších funkcí. Mohou se vyskytovat i jako antibiotika či jedy.^[37,38,39]

Peptid je chemická sloučenina organického původu, která vzniká spojením 2 až 50 aminokyselin pomocí peptidové vazby. Základních kódovaných aminokyselin je 20, 8 z nich je pro člověka esenciálních. Podle počtu aminokyselin se peptidy dělí na oligopeptidy, které obsahují do 10 aminokyselin, a polypeptidy, které jsou vytvořené z více aminokyselin a u kterých se projevuje polymerní charakter. Peptidy vznikají buď sekundárně z proteinů nebo jednoduchou biosyntézou bez použití proteosyntetického aparátu. Peptidy lze syntetizovat i uměle pro terapeutické využití.^[37,38]

1.3.1 Pentapeptidy

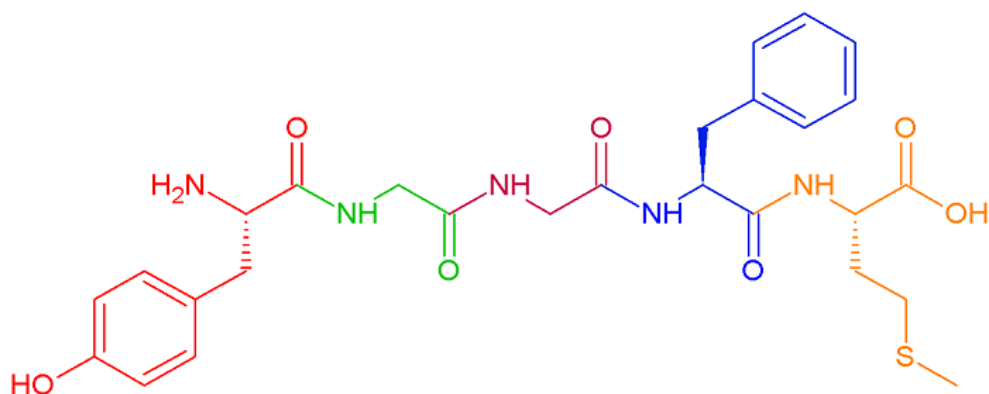
Pentapeptidy patří mezi oligopeptidy. Jsou složeny z pěti aminokyselin, které jsou vzájemně propojené peptidovou vazbou. Mezi pentapeptidy se řadí skupina enkefalinů, které jsou produkovány neuroendokrinním systémem, což je síť hormonálně aktivních buněk umístěných v organismu.^[40]

1.3.1.1 Enkefaliny

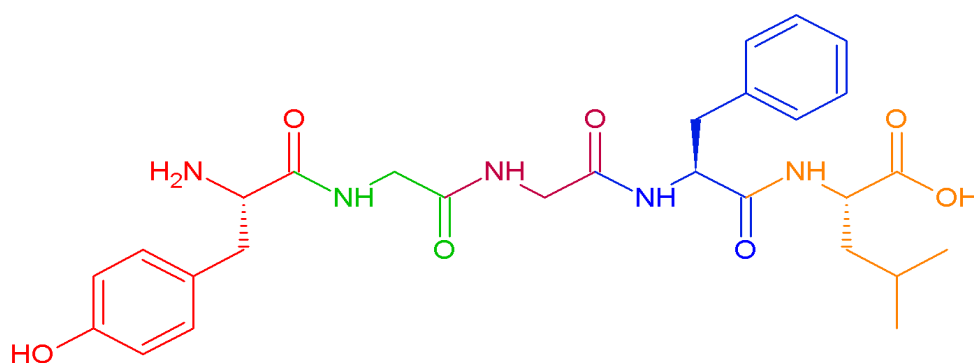
Enkefaliny se řadí mezi první objevené opioidní neuropeptidy, které se přirozeně vyskytují v nervové soustavě obratlovců.^[41,42] Endogenní opiátový peptidový systém je tvořen třemi skupinami, a to enkefaliny, endorfiny a dynorfiny. U člověka jsou popsány pouze dva zástupci skupiny enkefalinů, a to metionin-enkefalin (obr. 5) a leucin-enkefalin (obr. 6).^[43]

Stejně jako další endogenní opioidy mohou být enkefaliny uvolňovány ve stavech vzrušení, fyzické námahy, sexuální aktivity a strachu.^[44] Poruchy v syntéze enkefalinů mohou vést k vážným mentálním onemocněním. Enkefaliny jsou v současné době intenzivně studovány ve spojitosti s autismem, Alzheimerovou nemocí

a Parkinsonovou nemocí.^[45] V *Tabulce 2* je uveden přehled primárních struktur pentapeptidů, kterými se tato práce zabývala.



Obr. 5.: Struktura metionin-enkefalinu. Tyrosin-Glycin-Glycin-Fenylalanin-Metionin.



Obr. 6.: Struktura leucin-enkefalinu. Tyrosin-Glycin-Glycin-Fenylalanin-Leucin.

Tabulka 2.: Sekvence aminokyselin studovaných pentapeptidů.

Název	Sekvence AMK
methionin ⁵ – enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
leucin ⁵ – enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
leucin ⁵ – enkefalinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH ₂
D-alanin ² , leucin ⁵ – enkefalin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu
D-alanin ² , leucin ⁵ – enkefalin – arginin	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg

Methionin a leucin enkefaliny fungují v lidském těle jako endogenní inhibitory bolesti, nacházejí se v nejvyšším množství například v nadledvinách nebo dřeni nadledvin. Kromě methion a leucin enkefalinu se jedná o syntetické deriváty, které by měly vykazovat vyšší účinnost oproti základním nativním enkefalinům. Především substituce tyrosinu v poloze 2 za D-alanin zvyšuje aktivitu těchto enkefalinů tím, že snižuje jejich odbourávání z organismu enzymatickou hydrolýzou.^[46,47]

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit hydroxymethyl methakrylátové monolitické kolony a využít je pro separaci modelových směsí biologicky aktivních látek, konkrétně peptidů s malým počtem aminokyselin. Některé připravené monolitické kolony byly testovány ve smyslu mechanické pevnosti a specifické permeability.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Veškerá chromatografická měření byla prováděna na kapilárním kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, USA), který se skládal z vakuového degasseru, gradientového čerpadla mobilní fáze, automatického dávkovače, detektoru s diodovým polem a s detekční celou o optické délce 1 cm. Vyhodnocování, sběr dat a zároveň i ovládání mikrokapalinového chromatografu probíhalo za pomoci počítačové stanice použitím softwaru ChemStation, verze B.04.01.SP1 od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

Monolitické kolony byly připravovány v křemenných kapilárách firmy Supelco (Bellefonte, USA) s vnitřním průměrem 320 μm a vnějším průměrem 430 μm . K termostatování kapilár během polymerizace byla používána sušárna Memmert UNB 400 (Schwabach, Německo). Polymerizační směs byla sonikována v ultrazvukové lázni Fisherbrand FB 15061 (Loughborough, Velká Británie).

Pro úpravu pH mobilních fází byl použit pH – metr Jenway (Felsted, Velká Británie) s kombinovanou elektrodou Jenway.

K navažování byly použity analytické váhy XE Series Model 100A od společnosti Denver Instrumentation Company (Bohemia, USA).

3.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda – voda upravená přístrojem Mili-Q water purification system (Milipore, USA)

Aminokyseliny – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

<i>L-glycin (gly)</i> – $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	99% čistota
<i>L-tyrosin (tyr)</i> – $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	98% čistota
<i>L-tryptofan (trp)</i> – $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	98% čistota
<i>L-lysin (lys)</i> – $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$	98% čistota
<i>L-histidin (his)</i> – $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	99% čistota

L-glutamin (*gln*) – C₅H₁₀N₂O₃ 99% čistota

L-kys. glutamová (*glu*) – C₅H₉NO₄ 99% čistota

Pentapeptidy – 99% čistota, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

*methionin*⁵ – *enkefalin* Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

*leucin*⁵ – *enkefalin* Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

*leucin*⁵ – *enkefalinamid* Tyr-Gly-Gly-Phe-LeuNH₂

[*D*-Ala²], *leucin*⁵ – *enkefalin* Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu

[*D*-Ala²], *leucin*⁵ – *enkefalin* – *arginin* Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg

Ostatní chemikálie:

Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)

styren (99,5%), butan-1,4-diol (99%), propanol (99%)

Merck (Darmstadt, Německo)

toluen (99%), divinylbenzen (pro syntézu), kyselina methakrylová (pro syntézu), ethylen dimethakrylát (98%)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

α,α' -azobisisobutyronitril (AIBN, 98%), acetonitril (HPLC grade), methanol (HPLC grade), N-(hydroxymethyl) methakrylamid (HMMAA, tech. – 52-55% (hm.) vodný roztok)

Lachema (Neratovice, ČR)

hydroxid sodný (p.a.), aceton (p.a.), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (p.a.)

Lachner (Neratovice, ČR)

izooktan (p.a.), kyselina fosforečná (p.a.)

Linde (Praha, ČR)

plynný dusík (99,999%)

3.3 Postup přípravy vzorků a mobilních fází

Všechny připravené vzorky byly skladovány při teplotě - 20 °C.

3.3.1 Příprava vzorků benzenu, toluenu, uracilu

Vzorky benzenu i toluenu, každý o objemu 1 ml a koncentraci 10 µl/ml, byly připraveny z 10 µl čisté chemikálie ředěním vodou na objem 1 ml. Takto připravené vzorky byly vždy ještě 100x naředěny mobilní fází, která byla pro měření použita.

Zásobní roztok uracilu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1 mg navážky v 1 ml 50/50 ACN/H₂O (v/v). Takto připravený vzorek byl následně 100x zředěn mobilní fází, která byla pro měření použita.

3.3.2 Příprava vzorků aminokyselin

Zásobní roztoky jednotlivých AMK byly připraveny o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ v 50/50 ACN/H₂O (v/v).

Takto připravené vzorky byly následně 50x ředěny mobilní fází, která byla pro měření použita.

3.3.3 Příprava vzorků pentapeptidů

Zásobní roztoky jednotlivých pentapeptidů byly připraveny o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ v 50/50 ACN/H₂O (v/v).

Pro optimalizaci separace peptidů byly vždy zásobní roztoky před každým měřením 50x naředěny použitou mobilní fází.

3.3.4 Příprava mobilních fází

Pro přípravu mobilní fáze „voda“ byla použita deionizovaná voda. Pro přípravu mobilní fáze „acetonitril“ byl použit čistý acetonitril.

Mobilní fáze „voda s 0,1% TFA“ a „acetonitril s 0,1% TFA“ byly připraveny tak, že do 500 ml deionizované vody či acetonitrilu bylo přidáno 500 µl trifluoroctové kyseliny (TFA). Mobilní fáze „voda s 0,05% TFA“ a „acetonitril s 0,05% TFA“ byly

připraveny tak, že do 500 ml deionizované vody či acetonitrilu bylo přidáno 250 μ l trifluoroctové kyseliny (TFA).

Mobilní fáze „fosforečnanový pufr“ o pH 2,5; 3,5; 5 a 6 o koncentraci 10 mM byly připraveny rozpuštěním vypočteného a naváženého množství dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) v 500 ml vody a následnou úpravou pH (měřeno pH-metrem). Požadované hodnoty pH bylo docíleno buď přidavkem 1M NaOH, nebo přidavkem kyseliny fosforečné (H_3PO_4).

3.4 Postup přípravy monolitických kolon

3.4.1 Příprava monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové

Příprava monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové byla převzata od Mgr. Jiřího Vojty.^[48]

V prvním kroku byla křemenná kapilára, potažená polyimidem s vnitřním průměrem 320 μ m, naplněna 1M roztokem NaOH, aby došlo k aktivaci jejího vnitřního povrchu. Oba konce kapiláry byly drženy ve vialkách s malým množstvím tohoto roztoku, zde byly ponechány po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla kapilára promyta nejprve deionizovanou vodou až do neutrálního pH (měřeno pH papírkem) a následně acetone. Propláchnutá kapilára byla sušena proudícím dusíkem či vzduchem po dobu 5 minut. Ve druhém kroku silanizace byla kapilára naplněna silanizačním roztokem tvořeným 10% 3-(methoxysilyl)propylmethakrylátem (γ -MAPS) rozpuštěným v toluenu, aby bylo možné monolit zakotvit ke stěně kapiláry. Konce kapiláry byly opět drženy při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin ve vialkách s malým množstvím silanizačního roztoku. Po uplynutí této doby bylo silanizační činidlo vymýváno 5 minut toluenem, poté byla kapilára ponechána po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Následné sušení bylo provedeno opět proudícím dusíkem či vzduchem po dobu 5 minut. Takto upravená kapilára byla připravena k naplnění polymerizační směsí.

Polymerizační směs byla připravována do skleněných vialek. Nejprve byl navážen iniciátor polymerizace AIBN, k němuž byl automatickou pipetou přidán

monomer i porogenní směs. Jako monomer byl přidán styren (ST), divinylbenzen (DVB), kyselina methakrylová (MAA) a jako porogenní činidlo byl přidán toluen (T) a izooktan (ISO). Vše bylo odváženo na analytických vahách. Množství jednotlivých složek polymerizační směsi ukazuje *Tabulka 3*.

Promíchaná polymerizační směs byla naplněna do kapiláry, a poté byly oba její konce drženy ve vialkách s malým množstvím této směsi. Polymerizace probíhala dvěma způsoby. Při prvním způsobu byla připravená kapilára termostatována při teplotě 70 °C po dobu 6 a více hodin. Při druhém byla připravená kapilára vložena do vodní lázně o teplotě 70°C. Vodní lázeň i s kapilárou byla vložena do sušárny předehřáté na teplotu 75 °C, aby se po celou dobu polymerizace udržela konstantní teplota vodní lázně na 70°C.

Plnění a promývání kapiláry bylo prováděno pouze gravitační silou. Kapiláry byly připravovány buď o délce cca 1 m, které byly po polymerizaci zkráceny na požadované délky, nebo o délce 20 - 25 cm a ty již zkracovány nebyly, pouze u nich byly zarovnány konce.

Na závěr byla monolitická kolona promývána přes noc mobilní fází složenou z 50/50 ACN/H₂O (v/v) při průtoku 0,5 µl/min.

Tabulka 3.: Zastoupení kyseliny methakrylové (MAA), styrenu (ST), divinylbenzenu (DVB), α,α' -azobisisobutyronitrilu (AIBN), toluenu (T) a izooktanu (ISO) v polymerizační směsi.

MAA [mg]	ST [mg]	DVB [mg]	AIBN [mg]	T [mg]	ISO [mg]
50,9	45,6	91,4	2	259	206,9

3.4.2 Příprava monolitických kolon na bázi hydroxymethyl methakrylátu (HMMA)

Příprava monolitických kolon na bázi hydroxymethyl methakrylátu byla převzata od Petry Holdšvendové.^[26]

U těchto monolitických kolon není silanizace potřeba, probíhala pouze aktivace vnitřního povrchu křemenné kapiláry ve třech jednoduchých krocích. Křemenná kapilára potažená polyimidem s vnitřním průměrem 320 μm byla naplněna 1M roztokem NaOH, aby došlo k aktivaci vnitřního povrchu převedením siloxanových skupin na silanolové. Oba konce kapiláry byly drženy v malém množství tohoto roztoku ve skleněných vialkách při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla kapilára promývána po dobu 30 minut deionizovanou vodou a následně sušena 5 minut proudícím vzduchem. Takto upravená kapilára byla připravena k naplnění polymerizační směsí.

Do vialek byla připravena polymerizační směs, která se skládala z iniciátoru polymerizace, funkčního monomeru, síťujícího činidla a porogenní směsi. Nejprve byl navážen iniciátor polymerizace AIBN, následně monomer N-(hydroxymethyl) methakrylamid (HMMA), síťující činidlo ethylen dimethakrylát (EDMA), porogenní směs butan-1,4-diol a propanol. Množství jednotlivých složek polymerizační směsi ukazuje *Tabulka 4*. Promíchaná polymerizační směs byla sonikována 10 minut a následně probublávána heliem po dobu 5 minut. Připravená směs byla naplněna do kapiláry, jejíž oba konce byly drženy ve vialkách s malým množstvím této směsi. Tímto způsobem připravená kapilára byla po dobu 20 hodin termostatována v sušárně předeřáté na teplotu 60 °C.

Plnění a promývání kapiláry bylo prováděno pouze gravitační silou. Kapiláry byly připravovány buď o délce cca 1 m, které byly po polymerizaci zkráceny na požadované délky, nebo o délce 25 - 30 cm, které již zkracovány nebyly, pouze u nich byly seříznuty a zarovnány konce.

Na závěr byla monolitická kolona přes noc promývána 95/5 (v/v) ACN/H₂O při průtoku 0,5 - 5 $\mu\text{l/min}$.

Tabulka 4.: Zastoupení butan-1,4-diolu, propanolu, α,α' -azobisisobutyronitrilu (AIBN), *N*-(hydroxymethyl) methakrylamidu (HMMAA) a ethylen dimethakrylátu (EDMA) v polymerizační směsi.

kolona	butan-1,4-diol [mg]	propanol [mg]	AIBN [mg]	EDMA [mg]	HMMAA [mg]	Délka [cm]
publikovaná množství	7,2	64,4	0,17	12,4	16,0	18
I	7,21	65,00	0,20	13,05	16,03	20
II	7,28	64,26	0,16	12,93	17,37	20
III	7,58	63,44	0,13	13,39	16,89	35
IV	8,13	64,02	0,11	12,55	15,93	35

3.5 Testování HMMA monolitických kolon

Při charakterizaci monolitické stacionární fáze byla určena mechanická pevnost a specifická permeabilita.

Nejprve byla sledována mechanická pevnost, při které byl měřen tlak na koloně při různém konstantním průtoku a různém typu mobilní fáze. Průtok mobilní fáze byl 1; 3; 5 a 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ vody, acetonitrilu a methanolu. Před měřením tlaku byla vždy kolona promývána 1 hodinu použitou mobilní fází. Tlak byl měřen po jeho ustálení v minutových intervalech po dobu 5 minut.

Následně byla zjišťována číselná hodnota specifické permeability, při které byl sledován průtok vody a acetonitrilu při konstantním tlaku po dobu 5 minut.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Monolitické kolony na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny metakrylové

Kolony byly připravovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.1., který vedl k osvojení si tvorby monolitických kolon. Při přípravách byly pozorovány některé postupy, které vedly k časové úspoře. Bylo zjištěno, že monolitické kolony je možné připravovat v kapilárách o délce 1 m a na požadovanou velikost je upravit až po polymerizaci. Sušení kapiláry je možné provádět i proudícím vzduchem, který byl injektován injekční stříkačkou. Polymerizace prováděná přímo v sušárně se projevila jako mnohem spolehlivější než polymerizace ve vodní lázni. To proto, že došlo ke zpolymerizování veškeré směsi jak v koloně tak i ve vialkách. Zároveň bylo zjištěno, že kapilára při promývání po dobu pouze 1 hodiny a při průtoku 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ vykazovala jisté znečištění, které se projevovalo nestabilitou základní linie, proto byl zvolen postup, při kterém docházelo k promývání přes noc při průtoku 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

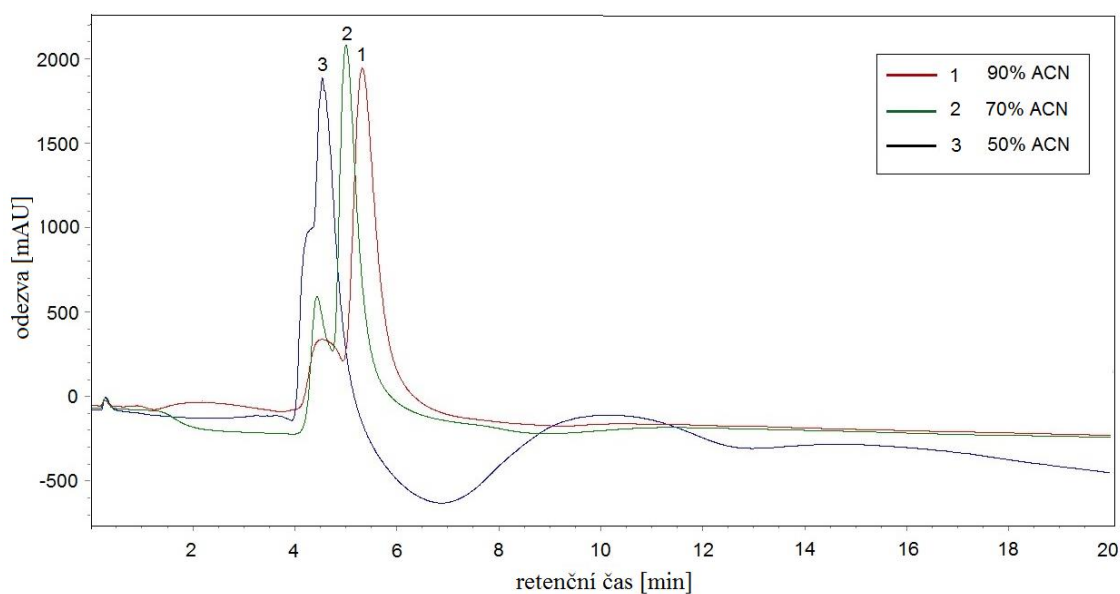
Připravené kolony byly testovány měřením vzorků benzenu, toluenu a uracilu. Měření prokázalo funkčnost připravených kolon, protože docházelo k zadržování analytů. Detekované píky byly pouze slabě rozmyté. Retenční čas benzenu byl 6,1 minuty; toluenu 5,5 minuty a uracilu 5,9 minuty. Tímto potvrzením funkčnosti připravených styrenových monolitů byla tato část práce ukončena a bylo přistoupeno k přípravě monolitických kolon, které byly předmětem předkládané diplomové práce, a to na bázi (N-hydroxymethyl) methakrylamidu (HMMA).

4.2 HMMA monolitické kolony

Kolony byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.2. Při přípravě těchto kolon bylo využito některých usnadňujících kroků, které byly zjištěny při přípravě monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové. Sušení bylo prováděno proudícím vzduchem a polymerizace byla uskutečněna pouze v sušárně bez vodní lázně. Tyto monolitické kolony nebylo vhodné připravovat v kapilárách o délce 1 m, protože polymerizační směs nezpolymerizovala v celé délce

kolony, a také pro velkou lámavost kapilár jak při promývání, tak při polymerizaci. Tento problém ale pravděpodobně nesouvisel se způsobem přípravy HMMA kolon, ale byl způsoben chybnou šarží křemenné kapiláry.

Na připravené HMMA monolitické koloně byly nejprve analyzovány látky, které se běžně používají pro testování stacionárních fází v RP – HPLC. Jako nepolární látky byly vybrány benzen a toluen. Tyto látky se ve všech zkoušených mobilních fázích na koloně nezadržovaly a eluovaly v mrtvém čase. Jako mobilní fáze byl použit 90/10, 70/30 a 50/50 ACN/H₂O (v/v). Tyto výsledky byly v souladu s předpokladem, protože připravené monolitické kolony by měly být spíše vhodné pro separaci polárních látek. Jako polární testovací látka byl pro připravenou HMMA kolonu použit uracil. Chromatogram uracilu naměřený při průtoku mobilní fáze 5 µl/min v mobilních fázích 90/10, 70/30 a 50/50 ACN/H₂O (v/v) a při použití detekční vlnové délky 254 nm je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7.: Chromatogram uracilu na HMMA monolitické koloně č. I.: mobilní fáze 90/10, 70/30 a 50/50 ACN/H₂O (v/v); průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 5 µl a detekční vlnová délka 254 nm.

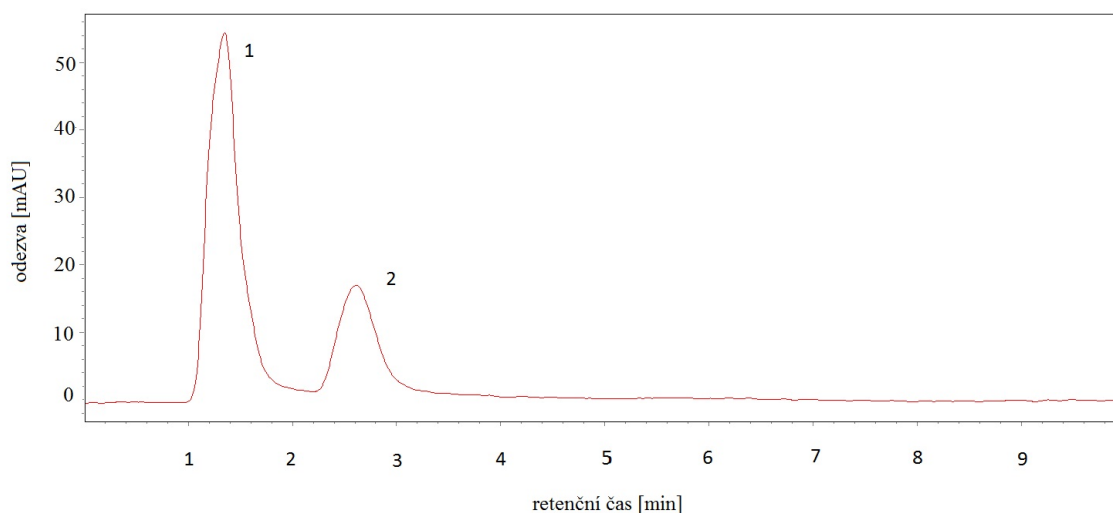
Z obr. 7 byl patrný náznak oddělení uracilu od mrtvého času u všech použitých mobilních fází a dále byl zaznamenán trend HILIC módu. To znamená, že s rostoucím

obsahem ACN docházelo k prodloužení retenčního času uracilu. Kvalita zaznamenaných píků není ideální, protože byly naměřeny na prvních připravených monolitických kolonách.

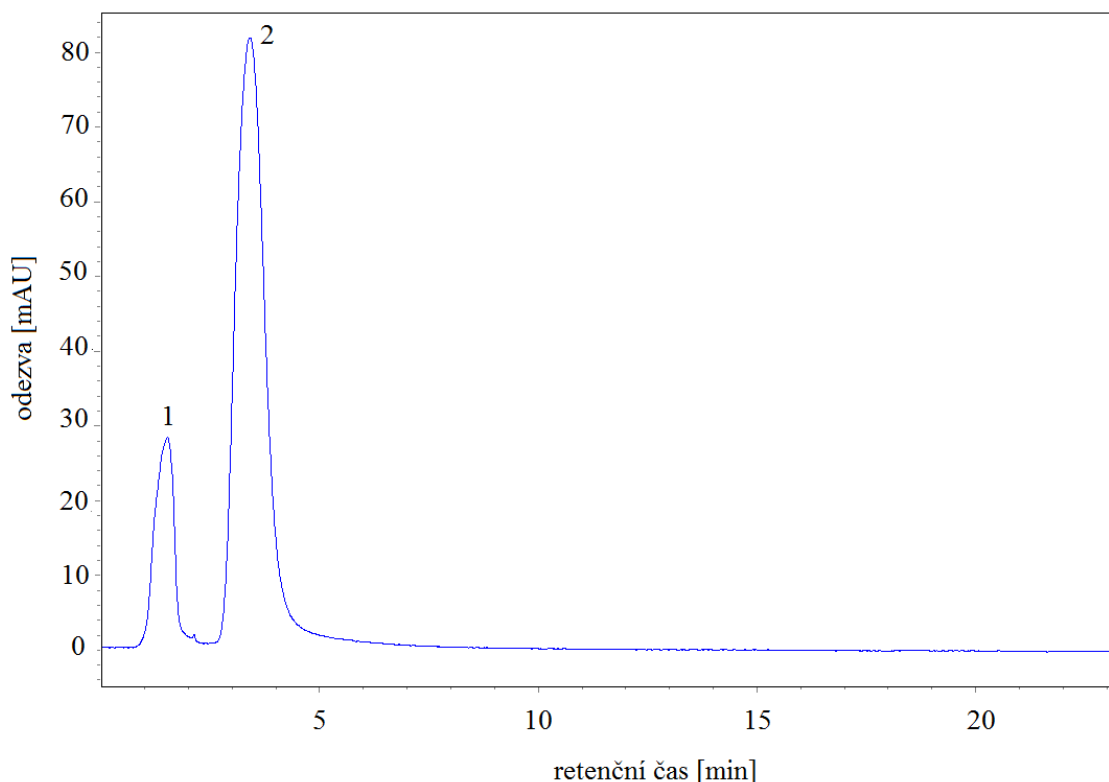
Jako další testovací látky pro testování funkčnosti a separačních vlastností byly vybrány standardy aminokyselin, a to: L-glycin (gly), L-tyrosin (tyr), L-tryptofan (trp), L-lysin (lys), L-histidin (his), L-glutamin (gln) a L-kyselina glutamová (glu). Testovací sady byly vybrány tak, aby obsahovaly zástupce z řady AMK s nabitým (his, lys, glu), nenabitým (tyr, gln) a nepolárním (trp) postranním řetězcem. Náboj je uveden při neutrálním pH.

Při separaci aminokyselin byl nejprve použit 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10 a 95/5 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze. Trifluoroctová kyselina je iontově párové činidlo, které se velmi často používá jako aditivum mobilní fáze pro separaci peptidů v reverzní chromatografii, ale i na PS-DVB monolitech^[49] a také výrazně snižuje pH vodné složky mobilní fáze. Chromatogramy AMK byly měřeny při průtoku mobilní fáze 5 µl/min, objemu nástřiku vzorku 5 µl a při použití detekční vlnové délky 214 nm. První měření byla provedena se vzorky AMK, které byly rozpuštěny v mobilní fázi bez trifluoroctové kyseliny. Tato měření vykazovala výrazné záporné píky, které komplikovaly detekci. Další měření již byla prováděna se vzorky, které byly rozpuštěny v mobilní fázi s 0,05% přídavkem kyseliny trifluoroctové kyseliny. Tato měření žádné výrazné záporné píky nevykazovala. Tím bylo zjištěno, že pro HILIC je zcela nezbytné vzorek rozpouštět přímo v mobilní fázi nebo alespoň v mobilní fázi, která je použité mobilní fázi co nejvíce podobná. Z tohoto důvodu byl vzorek vždy rozpouštěn v mobilní fázi, která byla pro separaci použita. Z naměřených výsledků byl patrný náznak oddělení L-glycinu, L-lysinu, L-glutaminu a L-kyseliny glutamové od mrtvého času až při použití 85/15 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze. Při použití 30/70; 50/50; 70/30; 75/25 a 80/20 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze se AMK na koloně nezadržovaly a eluovaly v mrtvém čase. U L-tyrosinu a L-histidinu byl náznak oddělení od mrtvého času patrný ještě při vyšší koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi, a to až při použití 95/5 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze. K nejlepšímu rozdělení AMK od mrtvého času

kolony dochází u všech AMK při použití mobilní fáze 95/5 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze, což ukazuje obr. 8 a obr. 9, kde je znázorněna analýza L-glycinu a L-tyrosinu. Na uvedených chromatogramech je vidět symetrický tvar píků obou studovaných aminokyselin, první pík v chromatogramu vždy přísluší mrtvému času. Retenční čas L-glycinu, aminokyseliny bez postranního řetězce, je kratší v porovnání s L-tyrosinem, který má aromatický postranní řetězec obsahující 4-hydroxyfenylovou funkční skupinu.



Obr. 8.: Chromatogram L-glycinu na HMMA monolitické koloně č. II: mobilní fáze 95/5 ACN/ H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny; průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 5 µl a detekční vlnová délka 214 nm. Identifikace píků: (1) mrtvý čas, (2) L-glycin.

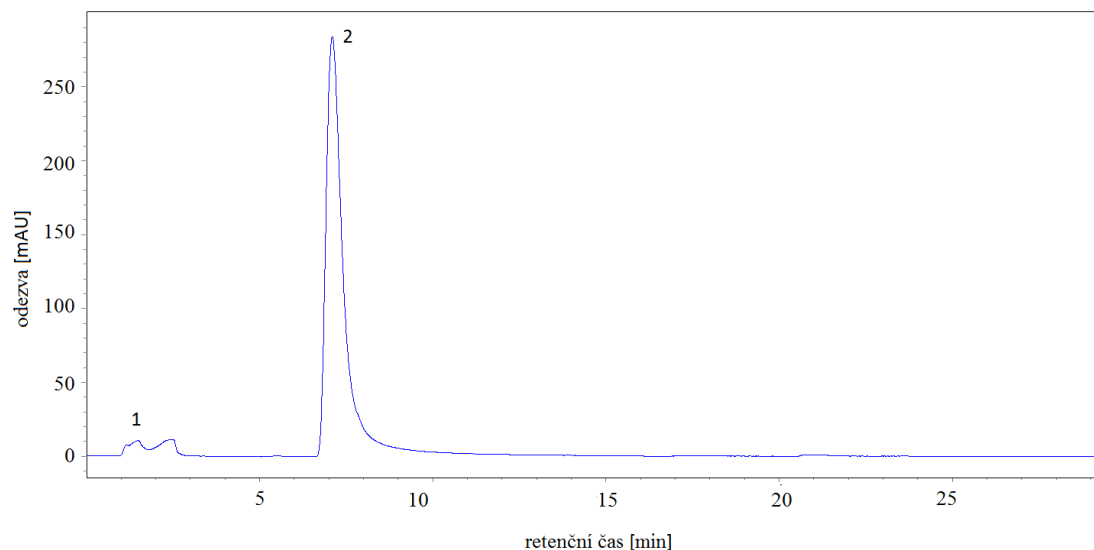


Obr. 9.: Chromatogram L-tyrosinu na HMMA monolitické koloně č. II: mobilní fáze 95/5 ACN/ H₂O (v/v) s 0,05% (v) přidavkem trifluoroctové kyseliny; průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 5 µl a detekční vlnová délka 214 nm. Identifikace píků: (1) mrtvý čas, (2) L-tyrosin.

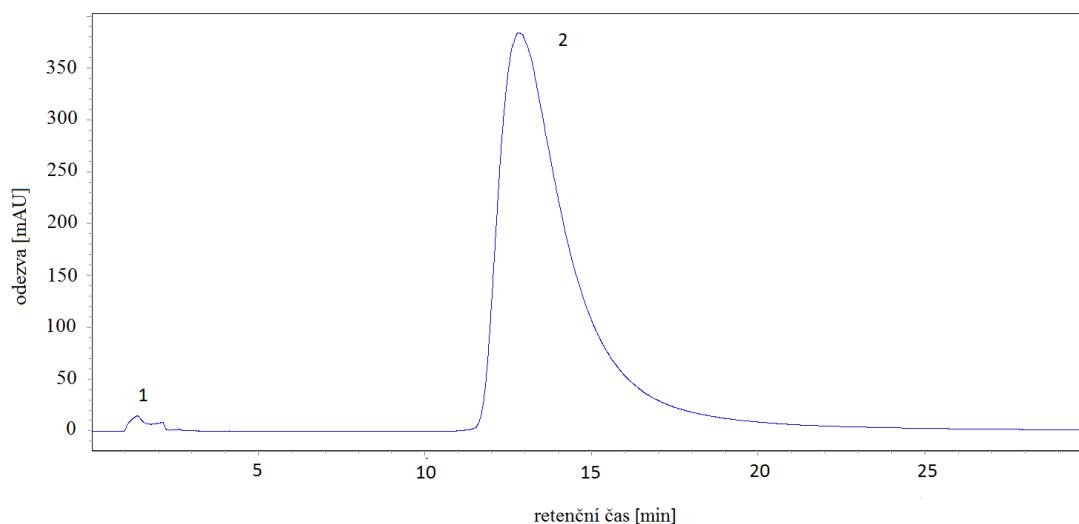
Následně byla použita jako mobilní fáze směs ACN s deionizovanou vodou, tedy mobilní fáze bez přidavku trifluoroctové kyseliny. Chromatogramy AMK byly měřeny při optimalizovaném poměru vodné a organické složky mobilní fáze, to znamená 95/5 ACN/H₂O (v/v). Porovnáním naměřených hodnot bylo zjištěno, že přidavek TFA ve vodné složce mobilní fáze výrazně nezlepšuje separaci, a proto je zbytečné ji do mobilní fáze přidávat. Zároveň se tím zachovala jednoduchost mobilní fáze, což je pro měření vhodnější. Při měření L-glycinu v mobilní fázi s TFA i bez TFA byly chromatogramy téměř totožné, což mohlo být způsobeno tím, že L-glycin nemá žádný postranní řetězec. U ostatních AMK se chromatogramy lišily velikostí i tvarem píků, které byly mnohem lepší u analýz, kde byla použita jako mobilní fáze směs ACN s deionizovanou vodou bez TFA. Porovnáním analýz, kde byla použita mobilní fáze s TFA a bez TFA bylo zjištěno, že u analýz s mobilní fází bez TFA došlo u L-tyrosinu,

L-tryptofanu a L-histidinu k prodloužení retence a ke zkrácení retence došlo u L-histidinu, L-glutaminu, L-kyseliny glutamové. Na obr. 10 a obr. 11 je znázorněna separace L-histidinu a L-tryptofanu při použití mobilní fáze bez přítomnosti TFA. Pro L-histidin, bazickou AMK, která v postranním řetězci obsahuje aromatickou imidazolovou funkční skupinu, byl získán jen velmi málo rozmytý pík eluující mezi 7. a 8. minutou. Naopak v případě L-tryptofanu, nepolární aromatické AMK s indolovým postranním řetězcem, byl zaznamenán déle se zadržující (13 minut) a výrazně rozmytý pík se šířkou píku při základně okolo devíti minut.

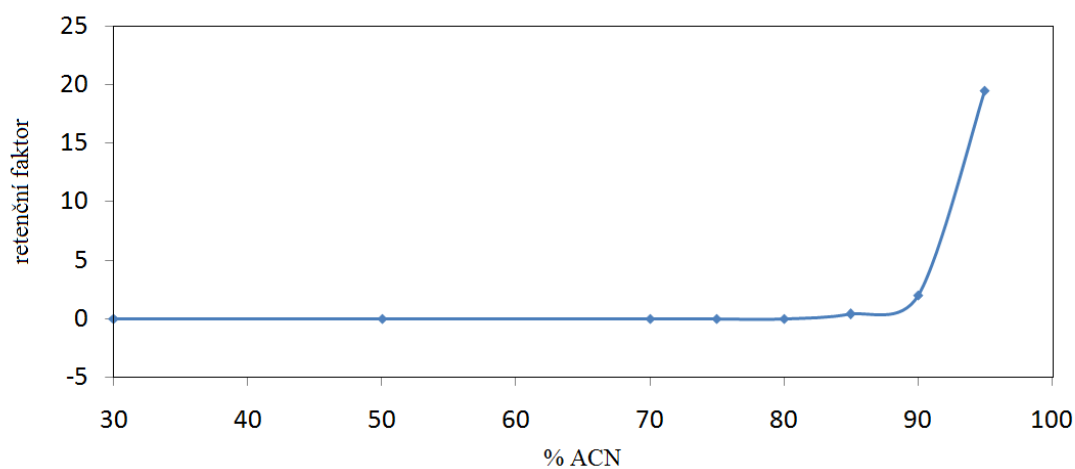
Na obr. 12 je znázorněna závislost retenčního faktoru L-histidinu na složení mobilní fáze. Retenční chování L-histidinu bylo studováno v rozmezí koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi v rozsahu 30 až 95 objemových procent. Z obr. 12 je patrné, že přibližně od mobilní fáze složené z 85/15 ACN/H₂O (v/v) se projevuje HILIC mechanismus, při kterém s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi roste retence L-histidinu. V oblasti 30 až 85% ACN nedocházelo oddělení AMK od mrtvého času. Velice podobný průběh závislosti retenčního faktoru na složení mobilní fáze byl zaznamenán i u ostatních studovaných aminokyselin.



Obr. 10.: Chromatogram L-histidinu na HMMA monolitické koloně č. II: mobilní fáze 95/5 ACN/ H₂O (v/v); průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástriku vzorku 5 µl a detekční vlnová délka 214 nm. Identifikace píků: (1) mrtvý čas kolony, (2) L-histidin.



Obr. 11.: Chromatogram L-tryptofanu na HMMA monolitické koloně č. II: mobilní fáze 95/5 ACN/ H₂O (v/v); průtok mobilní fáze 5 μ l/min, objem nástřiku vzorku 5 μ l a detekční vlnová délka 214 nm. Identifikace píků: (1) mrtvý čas kolony, (2) L-tryptofan.



Obr. 12.: Závislost retenčního faktoru L-histidinu na obsahu ACN v mobilní fázi: mobilní fáze 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10 a 95/5 ACN/H₂O (v/v), průtok mobilní fáze 5 μ l/min, objem nástřiku vzorku 5 μ l a detekční vlnová délka 214 nm.

Nakonec byla pro separace AMK vyzkoušena pufovaná mobilní fáze „fosforečnanový pufr“ o pH 2,5; 3,5; 5; 6 a o koncentraci 10 mM. Díky velkým problémům s lámavostí kapilár a vysokými tlaky na koloně nebyly získány žádné výsledky, které by přispěly k řešení problematice.

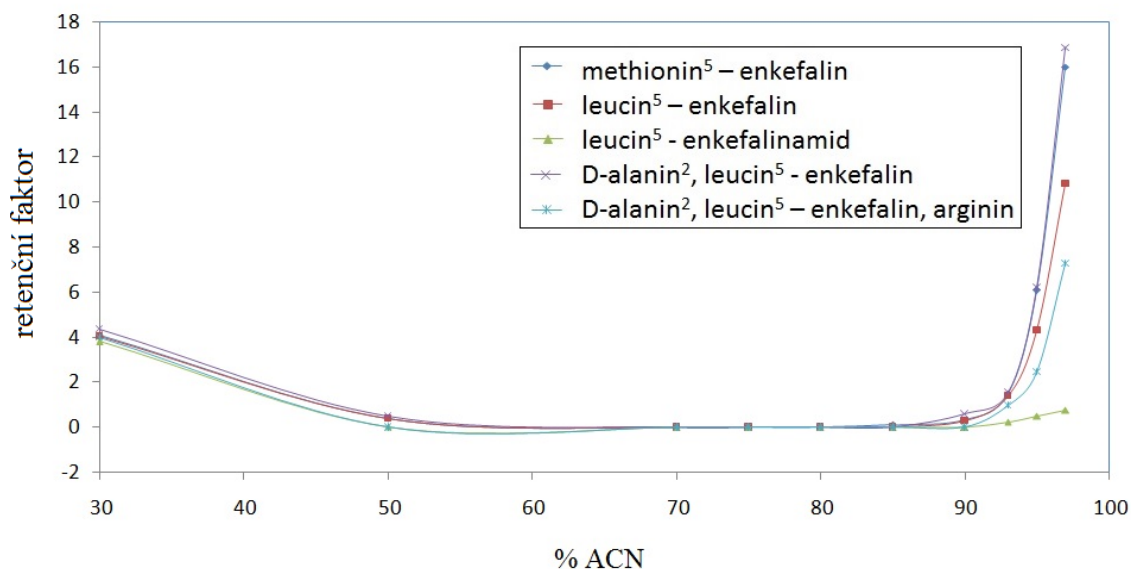
Dále bylo zkoumáno, zda retenční chování AMK v HILIC módu neovlivňuje sestupná a vzestupná změna zastoupení ACN v mobilní fázi. Nejprve byla sbírána data při vzestupném zvyšování ACN/H₂O 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10; 95/5 a 100/0 (v/v) a následně byla sbírána data při sestupném klesání ACN/H₂O od 100/0 do 30/70 (v/v). Toto měření bylo provedeno pouze u dvou vzorků AMK, a to u L-tyrosinu a L-tryptofanu. Zjištěné hodnoty prokázaly, že sestupná a vzestupná změna obsahu acetonitrilu v mobilní fázi nemá na separaci žádný vliv.

Jako modelové vzorky pentapeptidů byly vybrány methionin⁵ – enkefalin; leucin⁵ – enkefalin; leucin⁵ – enkefalinamid; [D-Alanin²], leucin⁵ – enkefalin; [D-Alanin²], leucin⁵ – enkefalin – arginin.

Při studiu separačního chování pentapeptidů byl nejprve použit jako mobilní fáze 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10 a 95/5 ACN/H₂O (v/v). Při měření bylo zjištěno, že přibližně od 90/10 ACN/H₂O (v/v) dochází k oddělení enkefalinů od mrtvého času, proto byla tato oblast intenzivněji proměřena použitím 93/7 a 97/3 ACN/H₂O (v/v). Porovnáním naměřených hodnot bylo zjištěno, že k nejlepšímu oddělení enkefalinů od mrtvého času docházelo při použití 95/5 ACN/H₂O (v/v). Zjištěné retenční časy a retenční faktory jsou uvedeny v *Tabulce 5*. Závislosti retenčních faktorů modelových vzorků pentapeptidů na obsahu ACN v mobilní fázi jsou znázorněny na obr. 13, z něhož vyplývá, že průběh těchto závislostí je podobný u všech analyzovaných enkefalinů. Jen u leucin⁵-enkefalinamidu je nárůst retenčního faktoru s rostoucím zastoupením acetonitrilu v mobilní fázi výrazně pomalejší než u ostatních studovaných enkefalinů. Dále je patrné, že v oblasti 30/70 až 50/50 ACN/H₂O (v/v) se projevuje reverzní mechanismus retence a přibližně od 85/15 ACN/H₂O (v/v) HILIC mechanismus, při kterém s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi roste retence enkefalinů.

Tabulka 5.: Naměřené retenční časy a retenční faktory jednotlivých enkefalinů: mobilní fáze 95/5 ACN/H₂O (v/v), průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 8 µl a detekční vlnová délka 214 nm.

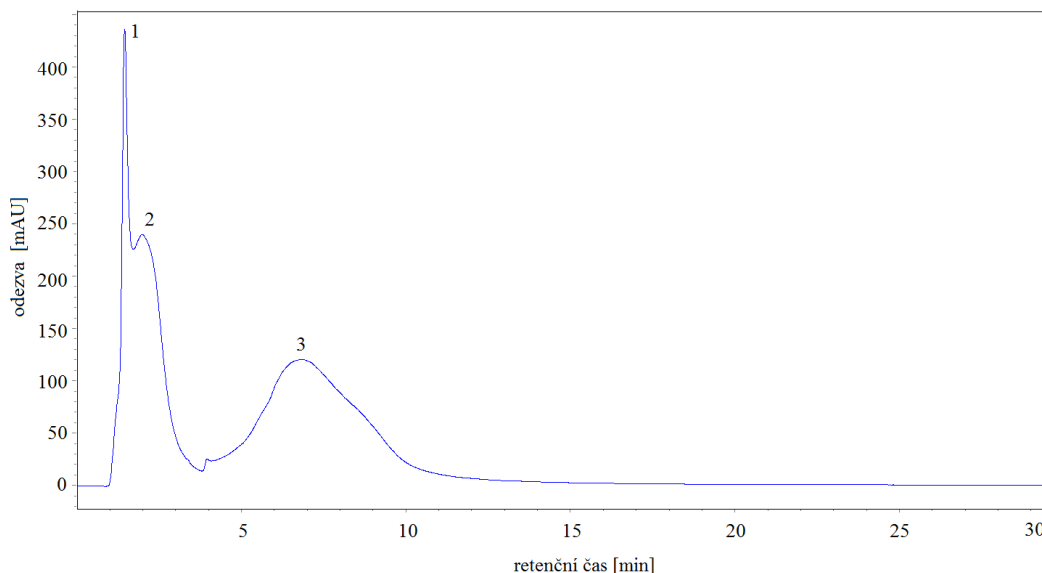
Název	Retenční čas t_R [min]	Retenční faktor k_i
methionin ⁵ – enkefalin	8,8	5,5
leucin ⁵ – enkefalin	7,0	4,3
leucin ⁵ – enkefalinamid	2,1	0,4
D-alanin ² , leucin ⁵ – enkefalin	6,4	3,9
D-alanin ² , leucin ⁵ – enkefalin – arginin	3,8	1,8



Obr. 13.: Závislost retenčního faktoru jednotlivých enkefalinů na obsahu ACN v mobilní fázi: mobilní fáze 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10 a 95/5 ACN/H₂O (v/v), průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 8 µl a detekční vlnová délka 214 nm.

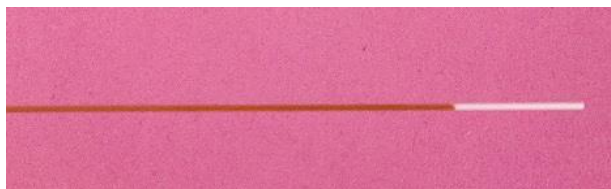
V optimalizovaném složení mobilní fáze byl proveden pokus o separaci směsi 2 enkefalinů. Vzorek směsi byl připraven smícháním 20 µl zásobního roztoku leucin⁵ – enkefalinu a 20 µl zásobního roztoku leucin⁵ – enkefalinamidu a následným

zředěním 95/5 ACN/H₂O (v/v) na výsledný objem 1 ml. Separace probíhala opět při průtoku mobilní fáze 5 µl/min, objemu nástřiku vzorku 8 µl a při použití detekční vlnové délky 214 nm. Získaný chromatogram je uveden na obr. 14.



Obr. 14.: Separace směsi 2 enkefalinů, leucin⁵ – enkefalinu a leucin⁵ – enkefalinamidu na HMMA koloně č. II: mobilní fáze 95/5 ACN/H₂O (v/v), průtok mobilní fáze 5 µl/min, objem nástřiku vzorku 8 µl a detekční vlnová délka 214 nm. Identifikace píků: (1) mrtvý čas kolony, (2) leucin⁵ – enkefalinamid a (3) leucin⁵ – enkefalin.

Průběh separace byl optimalizován i použitím vyššího průtoku mobilní fáze, a to na hodnotu 15 µl/min. Tím došlo k porušení chemické vazby mezi monolitem a vnitřní stěnou kapiláry, k následnému vytlačení monolitu z křemenné kapiláry a jejímu zlomení. Na obr. 15 je fotografie uvolněného monolitu.



Obr. 15.: Fotografie uvolněného HMMA monolitu z křemenné kapiláry v důsledku porušení vazeb mezi vnitřní stěnou kapiláry a monolitem.

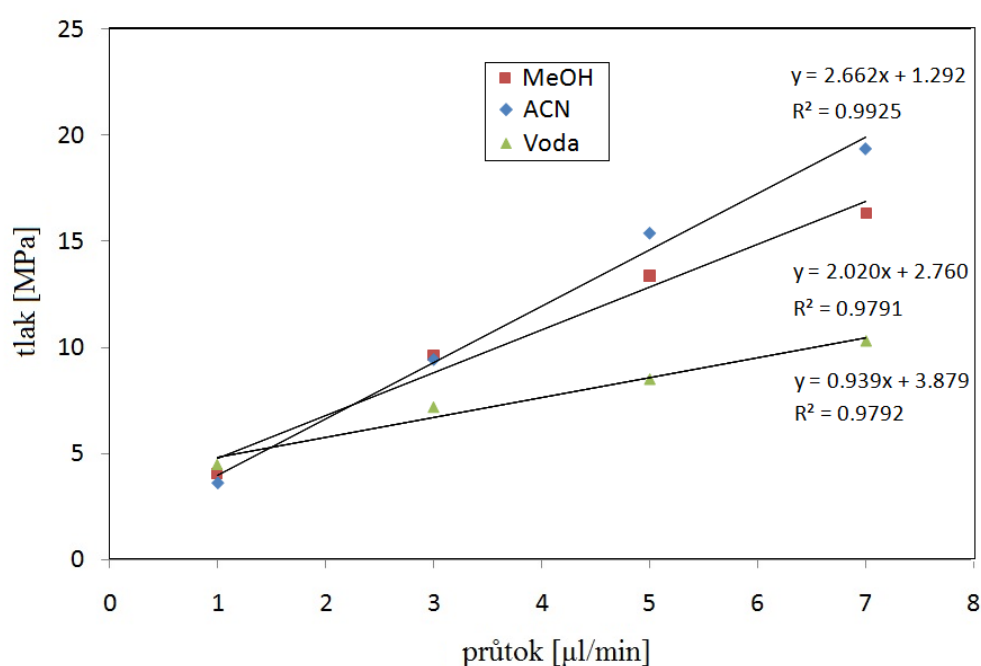
Následně byly připraveny další monolitické kolony podle stejného postupu, ale i u nich docházelo k neustálému lámání, případně připravené kolony nebyly průchozí pro mobilní fázi. Tím se do budoucna toto téma ještě otevírá k dalšímu podrobnějšímu zkoumání, které z časových důvodů nemohlo být dokončeno.

4.3 Testování připravené HMMA monolitické kolony

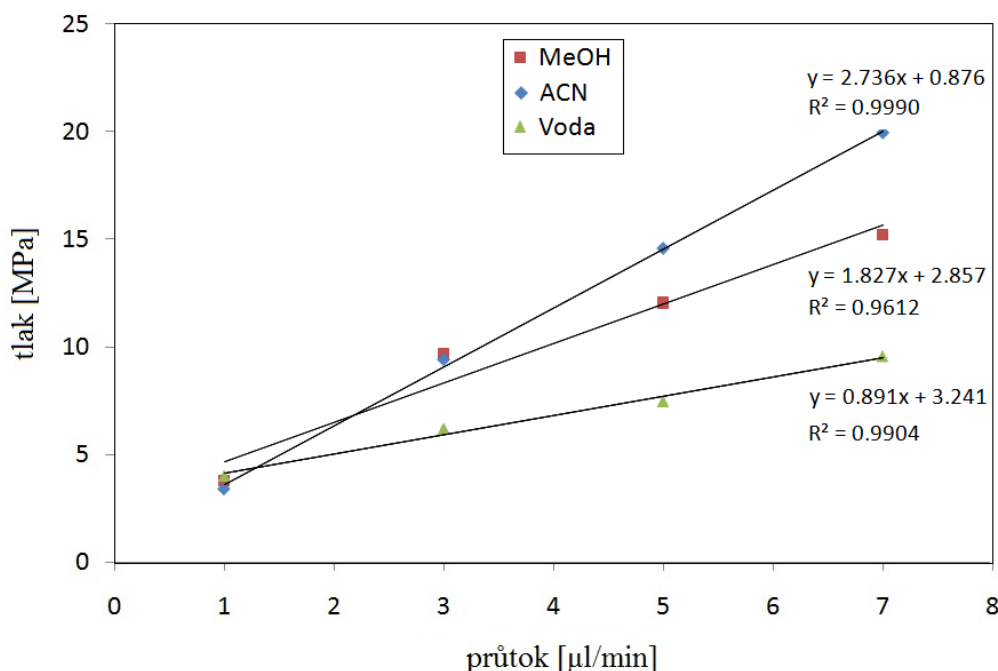
Při charakterizaci monolitické stacionární fáze III a IV byla určena jejich mechanická pevnost a specifická permeabilita. Porézní polymerní stacionární fáze ve styku s organickými rozpouštědly mohou vykazovat oslabenou mechanickou pevnost, a proto může docházet k deformaci monolitu vysokým tlakem. Za účelem vyhodnocení mechanické stability připravených monolitů, byl měřen tlak na koloně při různém konstantním průtoku 1; 3; 5 a 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ a různém typu mobilní fáze konkrétně vody, acetonitrilu a methanolu. Před měřením tlaku byla vždy kolona promývána 1 hodinu použitou mobilní fází. Tlak byl měřen po jeho ustálení v minutových intervalech po dobu 5 minut. Výsledné hodnoty byly získány aritmetickým průměrem pěti naměřených hodnot. Obr. 16 a obr. 17 znázorňuje závislosti tlaku v monolitické koloně III a IV na různém konstantním průtoku mobilní fáze methanolu, acetonitrilu a vody.

Při hodnocení mechanické stability bylo vycházeno z článku H. Oberachera a kol.^[49] Zde se uvádí, že nejvyšší tlak byl pozorován na koloně při průtoku vody a nejnižší byl při průtoku acetonitrilu, což odpovídá hodnotě viskozity použitých rozpouštědel. Z obr. 16 a obr. 17 je patrné, že mnou připravené monolitické kolony III a IV vykazují nejvyšší tlaky při průchodu ACN a nejnižší při průtoku vody. Tím se tedy mé výsledky rozcházejí s citovanou prací, kde byl ale studován nepolární polystyren-divinylbenzenový monolit. Možné vysvětlení může být snad založeno na různém stupni bobtnání HMMA monolitu v závislosti na použitém rozpouštědle, protože na základě srovnání viskozity použitých rozpouštědel, by měl tlak na mnou pozorovaném monolitu klesat v pořadí voda – methanol – acetonitril. V článku H. Oberachera a kol.^[50] byla dále pozorována lineární závislost tlaku na koloně na průtoku mobilní fáze pro všechna studovaná rozpouštědla (tetrahydrofuran, voda, methanol, acetonitril). To znamená, že nedocházelo k narušení a tlakové deformaci monolitu ani při průtoku mobilní fáze, který odpovídal tlaku 250 bar (25 MPa). U mnou připraveného HMMA monolitu byla pozorována lineární závislost tlaku na průtokové rychlosti jen

pro acetonitril, a to pro obě testované monolitické kolony (korelační koeficient 0,9962 pro kolonu III a 0,9995 pro kolonu IV). Při použití acetonitrilu je tedy permeabilita připravených HMMA kolon neměnná až do vstupního tlaku 20 MPa. Při použití methanolu a vody je korelace mezi tlakem na koloně a průtokovou rychlostí mobilní fáze horší (pro vodu je korelační koeficient 0,9895 pro kolonu III a 0,9952 pro kolonu IV, pro methanol je korelační koeficient 0,9895 pro kolonu III a 0,9804 pro kolonu IV). Zda je tento fakt výsledkem narušení jednotnosti monolitu působením použitých rozpouštědel, jeho bobtnáním, nebo zda je to způsobeno chybou při odečtu tlaku nelze v tuto chvíli rozhodnout.



Obr. 16.: Závislost tlaku v HMMA monolitické koloně III na různém konstantním průtoku mobilní fáze methanolu, acetonitrilu a vody při délce kolony 35 cm, 320 μm I.D. Korelační koeficienty ACN – 0,9962; MeOH – 0,9895 a voda – 0,9895.



Obr. 17.: Závislost tlaku v HMMA monolitické koloně IV na různém konstantním průtoku mobilní fáze methanolu, acetonitrilu a vody při délce kolony 35 cm, 320 μm I.D. Korelační koeficienty ACN - 0,9995; MeOH – 0,9804; voda – 0,9952.

Následně byla zjišťována na koloně III a IV číselná hodnota specifické permeability. Průtok mobilní fáze vody při konstantním tlaku 90 bar na monolitické koloně III byl 5,5 μl/min a na monolitické koloně IV byl 5,7 μl/min. Průtok mobilní fáze acetonitrilu při konstantním tlaku 90 bar na monolitické koloně III byl 3,45 μl/min a na monolitické koloně IV byl 3,15 μl/min. Hodnota specifické permeability byla vypočítána podle vzorce^[50]: $K = u\eta L/\Delta p$. Hodnoty viskozity použitých rozpouštědel, potřebné pro výpočet specifické permeability, byly převzaty z publikace.^[49] Specifická permeabilita kolony III a IV při použití mobilní fáze acetonitrilu byla řádově $2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$. Specifická permeabilita kolony III a IV při použití mobilní fáze deionizované vody byla řádově $9 \times 10^{-14} \text{ m}^2$. Hodnoty specifické permeability pro kolony III a IV jsou si velmi podobné, což je dáno velmi podobnými průtokovými rychlostmi mobilní fáze na obou studovaných monolitech. Specifická permeabilita kolony při použití vody je vyšší než při použití acetonitrilu.

5 Závěr

Cíle této práce byly splněny. Nejprve došlo k osvojení tvorby monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové. Během jejich příprav došlo ke zjištění, že je lze monolitické kolony připravovat v kapilárách o délce 1 m a na požadovanou velikost je upravit až po polymerizaci. Sušení kapiláry je možné provádět i proudícím vzduchem, který je injektován injekční stříkačkou. Polymerizaci lze provádět přímo v sušárně, což se jevílo jako mnohem spolehlivější způsob než polymerizace ve vodní lázni. Funkčnost monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové byla prokázána měřením vzorků benzenu, toluenu a uracilu.

Dále byly připravovány HMMA monolitické kolony. Při jejich přípravě byly využity některé usnadňující kroky, které byly zjištěny při přípravě monolitických kolon na bázi styrenu, divinylbenzenu a kyseliny methakrylové. Tyto kolony se připravovaly v délce maximálně do 40 cm z důvodu velké lámavosti, a také proto, že nedocházelo k polymerizaci v celé délce kolony.

Připravené HMMA monolitické kolony byly testovány pro separaci nepolárních látek, z nichž byly vybrány benzen a toluen. Tyto látky se v souladu s předpokladem v mobilních fázích 90/10, 70/30 a 50/50 ACN/H₂O (v/v) na koloně nezadržovaly a eluovaly v mrtvém čase. Dále byl na HMMA monolitické koloně analyzován polární uracil, který se při použití mobilní fáze 90/10, 70/30 a 50/50 ACN/H₂O (v/v) na koloně zadržoval a byl u něj zaznamenán trend HILIC módu. To znamenalo, že s rostoucím obsahem ACN docházelo k prodloužení retenčního času uracilu.

Následně byly HMMA monolitické kolony použity pro separaci vybraných aminokyselin. Jako mobilní fáze byl nejprve použit 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10 a 95/5 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze. Bylo konstatováno, že pro HILIC je zcela nezbytné vzorek rozpouštět přímo v mobilní fázi nebo alespoň v mobilní fázi, která je použité mobilní fázi co nejvíce podobná, aby nedocházelo k vykazování záporných píků, které komplikovaly detekci. Dále bylo zjištěno, že k nejlepšímu rozdělení AMK od mrtvého času kolony dochází u všech AMK při použití mobilní fáze 95/5 ACN/H₂O (v/v) s 0,05% (v) přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) ve vodné složce mobilní fáze. Další měření probíhala s mobilní fází 95/5 ACN/H₂O (v/v). Porovnáním

naměřených hodnot bylo zjištěno, že TFA není nutné do mobilní fáze přidávat. U všech měřených AMK se přibližně od 85/15 ACN/H₂O (v/v) projevoval HILIC mechanismus, při kterém s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi rostla jejich retence. Při zkoušení pufované mobilní fáze „fosforečnanový pufr“ o pH 2,5; 3,5; 5; 6 a o koncentraci 10 mM nebyly získány žádné výsledky, které by přispěly k řešení dané problematiky. Zkoumání sestupné a vzestupné změny zastoupení ACN v mobilní fázi prokázalo, že separaci neovlivňuje.

Při studiu separačního chování pentapeptidů byl nejprve použit jako mobilní fáze 30/70; 50/50; 70/30; 75/25; 80/20; 85/15; 90/10; 93/7; 95/5 a 97/3 ACN/H₂O (v/v). K nejlepšímu oddělení enkefalinů od mrtvého času docházelo při použití v 95/5 ACN/H₂O (v/v). Z měření bylo patrné, že v oblasti 30/70 až 50/50 ACN/H₂O (v/v) se projevoval reverzní mechanismus retence a přibližně od 85/15 ACN/H₂O (v/v) HILIC mechanismus, při kterém s rostoucím obsahem ACN v mobilní fázi rostla retence enkefalinů. Pokus o separaci směsi 2 enkefalinů v optimalizovaném složení mobilní fáze byl úspěšný jen částečně, protože při následném zvýšení průtokové rychlosti na 15 μ l/min došlo k porušení chemické vazby mezi monolitem a vnitřní stěnou kapiláry, k následnému vytlačení monolitu z křemenné kapiláry a jejímu zlomení. Nadměrná lámavost se opakovala i u dalších připravených HMMA monolitických kolon.

Na závěr byla u HMMA monolitických kolon III a IV zkoumána mechanická pevnost a specifická permeabilita. Při hodnocení mechanické stability došlo k rozporu s výsledky z článku H. Oberachera a kol.^[49] Připravené HMMA monolitické kolony vykazovaly nejvyšší tlaky při průchodu ACN, nejnižší při průtoku vody a lineární závislost tlaku na průtokové rychlosti byla jen u kolony IV pro acetonitril, případně pro vodu. Specifické permeability kolony III a IV si byly velmi podobné, což bylo dáno velmi podobnými průtokovými rychlostmi mobilní fáze na obou studovaných monolitech. Specifická permeabilita kolony III a IV při použití mobilní fáze acetonitrilu byla řádově $2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$. Specifická permeabilita kolony III a IV při použití mobilní fáze deionizované vody byla řádově $9 \times 10^{-14} \text{ m}^2$.

Citace

1. Vissers, J. P.: Recent developments in microcolumn liquid chromatography. *Journal of chromatography A* **856**:1, 117-143 (1999).
2. Novotný, M.: Recent advances in microcolumn liquid chromatography. *Analytical chemistry* **60**:8, 500A-510A (1988).
3. Ishii, D.; Takeuchi, T.: Miniaturization in column liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **9**:5, 152-157 (1990).
4. Guiochon, G.: Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1168**:1, 101-168 (2007).
5. Oberacher, H.; Huber, Ch. G.: Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**:3, 166-174 (2002).
6. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Nakladatelství Karolínium 2003.
7. Motyka, K.; Hlaváč, J.: *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd., Univerzita Palackého v Olomouci 2009.
8. URL: <http://www.hplc.cz/> [Přístup 22. července 2015]
9. URL:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es002_v1/hesla/chromatografie_s_obracenymi_fazemi.html [Přístup 22. července 2015]
10. URL: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [Přístup 30.července 2015]
11. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum 2004.
12. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. upr. a dopl. vyd. Ostrava 2003.
13. URL: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20ruzny%20typy%20detekce%20pro%20analyzu%20biologicky%20vyznamnych%20latek.pdf [Přístup 6. července 2015]
14. URL: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_24.pdf [Přístup 22. července 2015]

15. Hjerten, S.: Standard and capillary chromatography, including electrochromatography, on continuous polymer beds (monoliths), based on water-soluble monomers. *Industrial & engineering chemistry research* **38**:4, 1205-1214 (1999).
16. Švec, F.: Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy* **98**, 232-238 (2004).
17. Tanaka, H.; et al.: Development of a novel octadecyl-bonded silica column and evaluation of its reliability in chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* **762**:1, 89-96 (1997).
18. Fujimoto, C.; Kino, J.; Sawada, H.: Capillary electrochromatography of small molecules in polyacrylamide gels with electroosmotic flow. *Journal of Chromatography A* **716**:1, 107-113 (1995).
19. Petro, M.; Švec, F.; Fréchet, J.M.: Molded continuous poly (styrene-co-divinylbenzene) rod as a separation medium for the very fast separation of polymers Comparison of the chromatographic properties of the monolithic rod with columns packed with porous and non-porous beads in high-performance liquid chromatography of polystyrenes. *Journal of Chromatography A* **752**:1, 59-66 (1996).
20. Peters, E. C.; et al.: Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry. *Analytical chemistry* **70**:11, 2288-2295 (1998).
21. Peters, E.C.; et al.: Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation. *Analytical chemistry* **70**:11, 2296-2302 (1998).
22. Švec, F.; Kurganov, A. A.: Less common applications of monoliths: III. Gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1184**:1, 281-295 (2008).
23. Vojta, J.; et al. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních meédií. *Chemické listy* **108**:2, 127-134 (2014).
24. Courtois, J.; et al.: A study of surface modification and anchoring techniques used in the preparation of monolithic microcolumns in fused silica capillaries. *Journal of separation science*, **29**:1, 14-24 (2006).
25. Švec, F.: Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *Journal of Chromatography A* **1217**:6, 902-924 (2010).

26. Holdšvendová, P.; et al.: Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods* **70**:1, 23-29 (2007).
27. Xiong, L.; Zhang, R.; Regnier, F. E.: Potential of silica monolithic columns in peptide separations. *Journal of Chromatography A* **1030**:1, 187-194 (2004).
28. Song, Y.; Funatsu, T.; Tsunoda, M.: Amino acids analysis using a monolithic silica column after derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-F). *Journal of Chromatography B* **879**:5, 335-340 (2011).
29. Ikegami, T.; et al.: Preparation of highly efficient monolithic silica capillary columns for the separations in weak cation-exchange and HILIC modes. *Journal of biochemical and biophysical methods* **70**:1, 31-37 (2007).
30. Huang, X.; et al.: Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry* **74**:10, 2336-2344 (2002).
31. Urban, J.; Švec, F.; Fréchet, J. M.: Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column. *Analytical chemistry* **82**:5, 1621-1623 (2010).
32. Vaast, A.; et al.: High-speed gradient separations of peptides and proteins using polymer-monolithic poly (styrene-co-divinylbenzene) capillary columns at ultra-high pressure. *Journal of Chromatography A* **1304**, 177-182 (2013).
33. Svobodová, A.; et al.: Monolithic columns based on a poly (styrene-divinylbenzene-methacrylic acid) copolymer for capillary liquid chromatography of small organic molecules. *Journal of Chromatography A* **1218**:11, 1544-1547 (2011).
34. Lubbad, S. H.; Buchmeiser, M. R.: Fast separation of low molecular weight analytes on structurally optimized polymeric capillary monoliths. *Journal of Chromatography A* **1217**:19, 3223-3230 (2010).
35. Smirnov, K. N.; et al.: Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly (divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic rod columns for separation of small molecules. *Journal of Chromatography A* **1218**:30, 5010-5019 (2011).

36. Nischang, I.; Brüggemann, O.: On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths. *Journal of Chromatography A* **1217**:33, 5389-5397 (2010).
37. Vodrážka, Z.: *Biochemie*, Academia Praha 1996.
38. Karlson, P.: *Základy biochemie*, Academia Praha 1981.
39. Sofrová, D. a kol.: *BIOCHEMIE - Základní kurz*, Karolinum Praha 1993.
40. Sha, A., Sun, H., Wang, Y.: Immunohistochemical observations of methionine-enkephalin and delta opioid receptor in the digestive system of *Octopus ocellatus*. *Tissue and Cell* **45**:1, 83-87 (2013).
41. Does, R. M.; et al.: In the African lungfish Met-enkephalin and Leu-enkephalin are derived from separate genes: cloning of a proenkephalin cDNA. *Neuroendocrinology* **72**:4, 224-230 (2000).
42. McDonald, L. K.; Joss, J. M.; Does, R. M.: The phylogeny of Met-enkephalin and Leu-enkephalin: studies on the holostean fish *Lepisosteus platyrhincus* and the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *General and comparative endocrinology* **84**:2, 228-236 (1991).
43. Tordjman, S.; et al.: Aggression and the three opioid families (endorphins, enkephalins, and dynorphins) in mice. *Behavior genetics* **33**: 5, 529-536 (2003).
44. Binder, M. D.; Hirokawa, N.: *Encyclopedia of neuroscience*. Vol. 3166. Berlin, Heidelberg: Springer 2009.
45. Soukupová, K.; Krafková, E.; Suchánková, J.; Tesařová, E.: Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins. *Journal of Chromatography A* **1087**:1, 104-111 (2005).
46. Jana Suchánková, Ph.D. práce, UK Praha 2001.
47. Yoshimasa, T. A. K. A. K. I.; et al.: Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma." *Journal of Clinical Investigation* **69**:3, 643 (1982).
48. Jiří Vojta, Diplomová práce, UK Praha 2011.
49. Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G.: Characterization of some physical and chromatographic properties of monolithic poly (styrene-co-divinylbenzene) columns. *Journal of Chromatography A* **1030**:1, 201-208 (2004).

50. Grafnetter, J.; et al.: Optimization of binary porogen solvent composition for preparation of butyl methacrylate monoliths in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1049**:1, 43-49 (2004).